اثر بذر گیاه خار مریم بر بیان ژن اینترلوکین شش (IL-6) کبدی در جوجه های گوشتی تغذیه شده با آفلاتوکسین B_1

فروزان مهر، م.*[۱]، منتظر تربتی، م.ب.[۱]، سریر، ه.[۱]، فانی مکی، ا.[۱]، محمدی، ح.ر.[۲]، ابراهیم زاده، ا.[۳].

دریافت: ۱۳۹۲/۰۳/۰۹ پذیرش: ۱۳۹۳/۰۴/۲۷

خلاصه

مطالعه حاضر با هدف اثر متعادل شونده بیان ژن کبدی اینترلوکین شش (IL-6)، توسط بذر گیاه خار مریم در جوجه های گوشتی تغذیه شده با آفلاتوکسین B_1 مورد ارزیابی قرار گرفت. تعداد ۹۶ قطعه جوجه گوشتی سویه راس ۳۰۸، به صورت تصادفی در چهار تیمار در ۴ تکرار و ۶ قطعه جوجه در هر واحد آزمایشی اختصاص داده شد، گروه ها شامل (۱) شاهد ۲) جیره پایه حاوی ppb ۵۰۰ آفلاتوکسین B_1، ۳) جیره پایه حاوی ۰/۵ درصد بذر گیاه خار مریم ۴) جیره پایه حاوی ppb ۵۰۰ آفلاتوکسین B_1 به همراه ۰/۵ درصد بذر گیاه خار مریم. در سی و پنجمین روز آزمایش به منظور بررسی تغییرات بیان ژن IL-6، ۳ نمونه بافت کبد از هر تیمار جمع آوری شد. پس از استخراج RNA از بافت کبد رونویسی معکوس به عمل آمد. همچنین، واکنش زنجیره ای پلی مراز (PCR) جهت تکثیر ژن اینترلوکین شش انجام شد. نتایج نشان داد که بیان ژن اینترلوکین شش در تیمار دریافت کننده آفلاتوکسین کاهش یافت، در حالی که بذر گیاه خار مریم به تنهایی بیان ژن مذکور را افزایش داد. متغییرهای مورد بررسی در این مطالعه نمایانگر کارایی و تأثیر مشخص خار مریم در کاهش اثرات منفی آفلاتوکسین در جوجه های گوشتی بود.

واژه‌های کلیدی: ژن اینترکولین ۶، کبد، جوجه گوشتی، تغذیه، بذر خار مریم، آفلاتوکسین B_1.

۱. گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بیرجند، بیرجند، ایران.

۲. گروه مدیریت بهداشت دام، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه سمنان، سمنان، ایران.

۳. مرکز تحقیقات دام های خاص، دانشگاه زابل، زابل، ایران.

*نویسنده مسؤول: **mojtabafrozanmehr@yahoo.com**

مقدمه

آفلاتوکسین ها گروه بزرگی از مایکوتوکسین ها می باشند که بوسیله گونه های خاصی از جنس آسپرژیلوس بویژه فلاووس (*Aspergillus flavus*) و پارازیتیکوس (*A. Parasiticus*) تولید می شود (Fani Makki و همکاران، ۲۰۱۴). متابولیت های ثانویه تولید شده به وسیله این قارچ ها شامل انواع B_1، B_2- ، G_1 و G_2 می باشد (Fani Makki و همکاران، ۲۰۱۳). عواقب این متابولیت ها در حیوانات بسیار خطرناک است. این عواقب از قبیل؛ اختلال در سیستم ایمنی، جهش زایی، سرطان زایی و ناقص الخلقه زایی بوده و امکان وقوع این موارد در انسان ها نیز وجود دارد. با توجه به اینکه ذرت از مواد خوراکی پایه در تغذیه طیور می باشد و محیط کشت مناسبی برای رشد آفلاتوکسین ها محسوب می گردد، استفاده از مواد خوراکی خنثی کننده آثار آفلاتوکسین در جیره طیور امری ضروری می باشد. کبد و کلیه، اندام های اصلی تجمع آفلاتوکسین ها هستند، زیرا آنها در تبدیلات زیستی این سم درگیر هستند (Anthony و همکاران، ۲۰۱۳). بذر گیاه دارویی خار مریم میتواند این آثار مخرب را از بین ببرد. از میوه های خار مریم ماده ای به نام سیلیمارین (Silymarin) که خود شامل سه ایزومر اصلی به نام های سیلیبین (Silybin A & B)، سیلی-دیانین (Silydianin) و سیلیکریستین (Silychristin) می باشد، استخراج می شود (Yunus و همکاران، ۲۰۱۱)، سیلیبین مؤثرترین ماده موجود در سیلیمارین است که به عنوان آنتی اکسیدان و محافظت کننده مؤثر کبدی شناخته شده است (Anthony و همکاران، ۲۰۱۳). Gazak و همکاران (۲۰۰۷)، مکانیسم اثر سیلی-مارین موجود در بذر گیاه خار مریم را در درمان سرطان ناشی از مصرف سموم قارچی، بطور کامل شرح دادند و افزودند؛ سیلیمارین موجود در این گیاه از طریق اثر بر فعالیتهای مربوط به هسته سلول و تأثیر بر میکروزوم سلولی کبدی، می تواند رادیکال های آزاد ناشی از مصرف سم آفلاتوکسین را کاهش و فعالیت سلولی جهت سنتز پروتئین را افزایش دهد. وقتی که نوتروفیل ها تحریک می شوند، سیلیمارین از آزاد شدن مایلوپراکسیداز از آنها جلوگیری میکند (Yunus و همکاران، ۲۰۱۱). سیلیمارین فیتوزوم های موجود در بذر گیاه خار مریم می تواند جراحات و تغییرات هیستوپاتولوژیکی کبدی ناشی از دریافت آفلاتوکسین B_1 را کاهش دهد (Grizzle و همکاران، ۲۰۰۹). آفلاتوکسین به عنوان بازدارنده سنتز پروتئین عمل کرده و در نتیجه، تولید مواد غیر اختصاصی خون که جهت دفاع طبیعی ضروری هستند کاهش می یابد (Yunus و همکاران، ۲۰۱۱). آفلاتوکسین از طریق اختلال در نقل و انتقال اسیدهای آمینه و رونوشت برداری m-RNA از سنتز پروتئین و DNA ممانعت کرده و در نتیجه، آنتیبادی ها در سطوح پایین تولید میشوند (Yunus و همکاران، ۲۰۱۱). آفلاتوکسین بدون ایجاد اختلال در تولید پادتن سیستم ایمنی را تضعیف می کند (Kearns و همکاران، ۲۰۰۶). اینترلوکین ها باعث تنظیم روابط بین لنفوسیت ها و سایر لکوسیت ها می شوند. IL-6، سایتوکاینی است که هم در ایمنی ذاتی و هم اکتسابی نقش دارد. بیگانه خوارهای تک هسته ای، سلول های اندوتلیال عروق، فیبروبلاست ها و سلول های دیگر در پاسخ به میکروب ها و سایتوکاین هایی نظیر IL-1، TNF و IL-6 را می سازند (Yunus و همکاران، ۲۰۱۱). IL-6 در ایمنی ذاتی، موجب ساخته شدن پروتئین های مرحله حاد توسط هپاتوسیت ها می شود. IL-6 همچنین در اثرات سیستمیک التهاب یا پاسخ مرحله حاد دخالت داشته و در ایمنی اکتسابی موجب رشد لنفوسیتهای B می گردد (Yunus و همکاران، ۲۰۱۱). در این پژوهش اثرات آفلاتوکسین B_1 و بذر گیاه دارویی خار مریم بر بیان ژن اینترلوکین شش (IL-6) به روش نیمه کمّی مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش کار

نحوه تولید سم آفلاتوکسین

جهت تولید سم آفلاتوکسین B_1، از قارچ آسپرژیلوس فلاووس تهیه شده از مرکز کلکسیون قارچ و باکتری سازمان پژوهش های علمی و صنعتی ایران (PTCC NO : 5004 (IR111، استفاده شد. قارچ مذکور بر روی محیط کشتPDA (Potato dextrose agar) منتقل و تکثیر شد. پس از تکثیر قارچ با انتقال آن بر روی برنج حاوی ۱۳ درصد رطوبت و استریل، شرایط تولید سم آفلاتوکسین B_1 به مدت هفت روز مهیا گردید. سپس مجموعه برنج ها و قارچ اتوکلاو شده و به صورت پودر درآمدند. میزان آفلاتوکسین B_1 موجود در ۲۵ گرم نمونه بدست آمده بوسیله تست TLC (Thin layer chromatography)، ۶۰ ppm اندازه گیری شد (فانی مکی و همکاران، ۱۳۹۱).

تیمارهای آزمایشی و تهیه نمونه های مورد آزمایش

در این پژوهش از برنامه ۳ مرحله ای جیره آغازین (۱ – ۱۴ روزگی)، رشد (۱۴–۲۸ روزگی) و پایانی (۲۸–۴۲ روزگی) استفاده شد. جیره ها بر اساس احتیاجات توصیه شده توسط کمپانی راس و با استفاده از نرم افزار UFFDA تنظیم شدند. در این آزمایش تعداد ۲۴ قطعه جوجه گوشتی سویه رآس ۳۰۸ در قالب طرح کامل تصادفی، با ۴ تیمار و ۶ تکرار، به مدت ۳۵ روز روی بستر پرورش داده شدند.

تیمارهای آزمایشی عبارت بودند از؛ ۱) تیمار شاهد (بدون اضافه کردن خار مریم یا آفلاتوکسین B_1)، ۲) ۵۰۰ ppb آفلاتوکسین B_1، ۳) ۰/۵ درصد خار مریم، ۴) ۰/۵ درصد خار مریم + ۵۰۰ ppb آفلاتوکسین B_1 (Fani Makki و همکاران، ۲۰۱۴). تیمارهای آزمایشی از یک تا ۳۵ روزگی در اختیار جوجه ها قرار گرفت. در سن ۳۵ روزگی از هر تیمار به طور تصادفی سه جوجه کشتار گردید و از بافت کبد آنها نمونه گیری به عمل آمد (مجموعاً ۱۲ نمونه بافتی کبد). بلافاصله نمونه های بافتی با استفاده از ازت مایع فریز شده و به آزمایشگاه بیوتکنولوژی دانشکده کشاورزی دانشگاه بیرجند منتقل شد. ضمناً نمونه گیری از جوجه ها با رعایت کامل حقوق حیوانات انجام گردید.

استخراج RNA از بافت کبد

به منظور استخراج RNA از نمونه های بافتی کبد، کیت Total RNA isolation kit خریداری شده از شرکت DENAzist Asia مورد استفاده قرار گرفت. مراحل انجام کار بدین شرح بود؛ ابتدا ۱۰۰ میلی گرم از بافت کبد در یک هاون چینی خرد گردید. سپس بافت خرد شده با استفاده از دستگاه هموژنایزر کاملاً ریز شد. آنگاه یک میلی لیتر بافر G_1 به میکروتیوب هموژنایزر اضافه شد و بوسیله ورتکس بافت خرد شده در داخل محلول به خوبی مخلوط گردید. میکروتیوب به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتیگراد و با سرعت ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. محلول فوقانی لوله به یک میکروتیوب جدید منتقل شد. میزان ۲۰۰ میکرو لیتر کلروفرم به هر میلی لیتر بافر G_1 حاوی بافت هموژنیزه شده افزوده شد و به مدت ۱۵ ثانیه ورتکس گردید. محتویات به مدت ۳ دقیقه در دمای آزمایشگاه انکوبه شدند. مجدداً، محتویات میکروتیوب به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. پس از اتمام سانتریفیوژ سه فاز تشکیل گردید. فاز بالایی حاوی RNA بوده که با احتیاط کامل از عدم آلودگی با فاز میانی به میکروتیوب جدید منتقل شد. در این مرحله، به نیمی از حجم مایع منتقل شده ایزوپروپانول و بافر G_2 اضافه شده و محتویات میکروتیوب به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. پس از اتمام سانتریفیوژ یک رسوب سفید رنگ نازک در ته میکروتیوب مشخص گردید. مایع رویی با احتیاط خارج شده و به رسوب باقی مانده یک میلی لیتر اتانول ۷۰ درصد افزوده شد. همچنین، به مدت ۵ ثانیه میکروتیوب ورتکس و سانتریفیوژ گردید. مایع رویی با احتیاط و با مشاهده مداوم رسوب ته میکروتیوب تخلیه گردید. در این مرحله به رسوب تقریباً خشک شده، ۳۰ تا ۱۰۰ میکرولیتر آب فاقد RNase اضافه شد. همچنین، درب میکروتیوب را بسته و آن را در دمای ۵۵ تا ۶۰ درجه سانتیگراد قرار داده تا RNA به خوبی در آب حل شود. در مرحله آخر، محلول حاصل که همان RNA است برای رونوشت برداری معکوس مورد استفاده قرار گرفت (Kashofer و همکاران، ۲۰۱۳).

ساخت cDNA

RNAی استخراج شده از بافت کبد بلافاصله برای انجام مرحله نسخه برداری معکوس و ساخت cDNA توسط کیت Reverse Aid H Minus شرکت فرمنتاز مورد استفاده قرار گرفت. پس از یخ زدایی، مخلوط کردن و سانتریفیوژ نمودن، اجزای کیت به مقدار جزیی روی یخ نگهداری شد. همچنین، ۲ میکرولیتر از RNA الگو، ۱ میکرولیتر Oligo_dT و ۹ میکرولیتر Depce-water به یک تیوب استریل Nuclease_free منتقل شد. سپس میکروتیوب کمی سانتریفیوژ و به مدت ۵ دقیقه در دمای ۶۵ درجه سانتیگراد داخل دستگاه PCR انکوبه شد. ترکیبات زیر بر اساس آنچه که در جدول شماره (۱) نشان داده شده است به میکروتیوب واکنش افزوده شده و به آرامی سانتریفیوژ گردید. در این مرحله، میکروتیوب ها در دمای ۴۲ درجه سانتی گراد به مدت ۶۰ دقیقه توسط دستگاه PCR انکوبه شدند. واکنش RT با قرار دادن میکروتیوب در دمای ۷۰ درجه سانتیگراد به مدت ۵ دقیقه خاتمه یافت (Osselaere و همکاران، ۲۰۱۳).

٤ میکرو لیتر	5X Reaction Buffer
۱ میکرو لیتر	(RiboLockTM RNase Inhibitor (20u/1µ
۲ میکرو لیتر	mM dNTP Mix 10
۱ میکرو لیتر	(RevertAid TM H Minus M-MuL Reverse Transcription (200u/1µ
۲۰ میکرولیتر	Total

جدول ۱. مواد افزوده شده به میکروتیوب جهت واکنش PCR

انجام واکنش PCR

به منظور بررسی بیان ژن در سطح RNA از روش RT-PCR استفاده شد. تمام نمونه های cDNA ابتدا از نظر بیان ژن مرجع (House Keeping) ارزیابی شدند. ژن مرجع انتخاب شده در این پژوهش، گلیسر آلدئید فسفات دهیدروژناز (Glyceraldehyde 3-phosphatedehydrogenase: GAPDH) بود. توالی آغازگرهای به کار رفته برای RT-PCR این ژن عبارت بود از؛

آغازگر رفت (Forward primer):

CCTCTCTGGCAAAGTCCAAG

آغازگر برگشت (Reverse primer):

CAACATCAAATGGGCAGATG

همچنین، توالی آغازگرهای به کار رفته برای ژن اینترلوکین شش (IL-6) عبارت بود از؛

آغازگر رفت: GACTCGTCCGGAGAGGTTG

آغازگر برگشت: CGCACACGGTGAACTTCTT

در هر واکنش که در حجم ۲۵ میکرولیتر انجام گرفت، ۲/۵ میکرولیتر بافر X 10، ۰/۵ میکرولیتر dNTP، ۰/۵ میکرولیتر Left Primer، ۰/۵ میکرولیتر Right Primer، ۲/۳ میکرولیتر Mgcl2، ۰/۵ میکرولیتر Taq polymerase، ۰/۵ میکرولیتر cDNA و ۱۸ میکرولیتر آب استفاده شد. برنامه دمایی تکثیر عبارت بود از؛ ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۳ دقیقه (واسرشته سازی اولیه)، ۹۴ درجه سانتی گراد ۳۰ ثانیه (واسرشته سازی ثانویه)، ۶۲ درجه سانتی گراد ۳۰ ثانیه (اتصال آغازگرها)، ۷۲ درجه سانتی گراد ۳۰ ثانیه (بسط آغازگرها) و ۷۲ درجه سانتی گراد ۱۰ (بسط نهایی آغازگرها) دقیقه بود. محصول هر واکنش RT-PCR روی ژل آگاروز ۲ درصد، الکتروفورز شد. این مرحله با ولتاژ ثابت ۷۵، به مدت ۱ ساعت انجام گردید. در نهایت پس از رنگ آمیزی ژل با اتیدیوم بروماید (Ethidium bromide)، بر اساس اندازه باندهای مشاهده شده تفسیر صورت گرفت.

نتایج

نتایج نشان دادکه بیان ژن اینترلوکین شش در همه تیمارهای آزمایشی با یکدیگر متفاوت است. بیان این ژن در تیمار دوم که در آن جوجه ها ppb۵۰۰ آفلاتوکسین B_1 در هر کیلوگرم خوراک دریافت کرده بودند نسبت به تیمار شاهد کاهش پیدا کرد. بلعکس، در تیمار سوم که گیاه خار مریم (۰/۵ درصد بذر گیاه دارویی خار مریم در هر کیلوگرم خوراک) به تنهایی مورد استفاده قرار گرفته بود، باندهای بزرگتری بر روی ژل الکتروفورز تشکیل گردید. همچنین در تیمار چهارم که آفلاتوکسین B_1 به همراه بذر گیاه دارویی خار مریم مورد استفاده قرار گرفته بود، بیان ژن مذکور افزایش پیدا کرد. شدت باندهای تشکیل شده در روی ژل الکتروفورز در تصویر ۱ نشان داده شده است.

تصویر ۱. باندهای تشکیل شده در ژل آگاروز

بحث

اینترلوکین‌ها (Interleukins) سایتوکاین های ساخته شده توسط انواع گویچه‌های سفید خون هستند که اغلب بر لنفوسیت‌های دیگر موثر می‌باشند (Nasir و همکاران، ۲۰۱۳). این ترکیبات در سیستم ایمنی نقش مهمی دارند. همچنین، بیان ژن IL-6 در انواع سلول ها مانند فیبروبلاست ها، کندروسیت ها، اپی تلیوم سینوویال، کبد، ریه و روده بزرگ (کولون) گزارش شده است (Culig & Puhr، ۲۰۱۲). این سایتوکاین (IL-6) عملکردهای پلئوتروپیکی در سلول های هماتوپویتیک، کبدی، استرومایی، اپی تلیالی، عصبی و استئوکلاستی دارد (Culig & Puhr، ۲۰۱۲). اخیراً اثبات شده است که افزایش بیان ژن IL-6 در تومور می تواند نشان دهنده پیش آگهی نامناسب سرطان کبد باشد (Nasir و همکاران، ۲۰۱۳). امروزه در مطالعات متعدد، عملکرد AFB1 در بروز و پیشرفت تومورهای مختلف گزارش شده و بر نقش پاتوژنیک آن در سرطان کبد تأکید گردیده است. این در حالی است که نقش بذر گیاه دارویی خار مریم در تومور زدایی به خوبی مشخص نیست. به همین خاطر، این مطالعه بر روی جوجه های گوشتی مبتلا به سرطان کبد اجرا گردید تا مشخص شود که آیا بروز تعادل ژنی IL-6 در تیمار چهارم (تیمار دریافت کننده آفلاتوکسین به همراه خار مریم)، میتواند تحت تأثیر سطوح مختلف بذر گیاه خار مریم باشد یا خیر. آنچه که در این پژوهش بیشتر جلب توجه نمود، کاهش بیان ژن IL-6 در نمونه های سرطانی بود. نتایج این پژوهش یافته های Yarru و همکاران، (۲۰۰۹) را تأیید می نماید. این محققان، کاهش محسوسی را در بیان ژن اینترلوکین شش در جوجه های تغذیه شده با آفلاتوکسین B_1 (۱ میلی گرم در هر کیلوگرم خوراک) مشاهده کردند. در حالی که، زرد چوبه (۷۴ میلی گرم در هر

کیلوگرم خوراک) بیان این ژن را افزایش داد. با توجه به یافته های این پژوهش و بررسی پژوهش های دیگر پیشنهاد می شود که گیاه دارویی خار مریم میتواند بازجذب کننده خوبی برای آفلاتوکسین B_1باشد، ولی باید مقادیر بالاتری از آن در جیره گنجانده شود. همچنین Hinton و همکاران، (۲۰۰۳) اثر آفلاتوکسین B_1 را بر بیان ژن های IL-6 و IL-1 در موشهای صحرایی جنس نر بررسی کردند، نتایج تحقیق آنها نشان داد که آفلاتوکسین بیان این دو ژن را افزایش می دهد. همچنین، این محققان نتیجه گرفتند که اثرات آفلاتوکسین بر روی سیستم ایمنی میتواند تحریک کننده و بازدارنده باشد.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از استاد ارجمند، جناب آقای دکتر حسام دهقانی که نهایت همکاری و مشاوره را در به انجام رسیدن موفق این پروژه مبذول نمودند، قدردانی می شود.

Journal of Veterinary Laboratory Research 6 (2014) 37-44

Effect of Thistle seeds on hepatic gene expression of interleukin 6 (IL-6) in broiler chickens fed with Aflatoxin B_1

Frouzanmehr, M.[1*], Montazer torbati, M.B.[1], Sarir, H.[1], Fani makki, O.[1], Mohammadi, H.R.[2]. Ebrahimzadeh, A.[3].

Received: 30.05.2013 Accepted: 18.07.2014

Abstract

The objective of the present study was to evaluate the efficacy of milk thistle seeds (MTS) to ameliorate gene expression of interleukin-6 (IL-6) in the livers of broiler chicks fed with aflatoxin B_1 (AFB1). 96 one-day-old (Ross 308) broiler chicks were used. They were randomly assigned to four treatments, 4 replicates and 6 birds in each unit. Group (1) was kept as a control and other groups received feed containing MTS and AFB1 for 3 weeks, i.e. 2) basal diet supplemented with 500 ppb of AFB1 per kg of feed, 3) basal diet supplemented with MTS (0.5%) and 4) basal diet supplemented with MTS (0.5%) and 500 ppb of AFB1 per kg of feed. On day 35 livers were collected (3 per treatment) to evaluate changes in the expression of IL-6 gene after reverse transcription of RNA extracted from liver tissue were taken. In addition, polymerase chain reaction (PCR) amplification was performed for IL-6. The result revealed expression of IL-6 decreased in treatments which is received AF while MTS alone increased IL-6 expression. The variables that were evaluated in this study showed that MTS had significant efficacy in diminishing the aflatoxin negative effects on the chickens.

Key words: Interleukin 6 gene, Liver, Broiler chicks, Nutrition, Thistle seeds, Aflatoxin B_1.

1. Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Biriand University, Birjand, Iran.

2. Department of Animal Health Management, Faculty of Veterinary Medicine, Semnan University, Semnan, Iran.

3. Research Center of Special Domestic Animal, Zabol University, Zabol, Iran.

*Corresponding author: **mojtabafrozanmehr@yahoo.com**

منابع

فانی مکی، ا. ۱۳۹۱. اثر سطوح مختلف بذر گیاه خار مریم بر روی نرخ رشد، برخی از متابولیت های خونی و مرفولوژی بافت کبد جوجه های گوشتی آلوده شده با آفلاتوکسین (ب۱). پایان نامه کارشناسی ارشد علوم دامی، دانشگاه بیرجند، بیرجند، ایران.

Anthony, K., Subramanya, G., Uprichard, S., Hammouda, F., Saleh, M. 2013. Antioxidant and anti-hepatitis C viral activities of commercial milk thistle food supplements. Antioxidants. **2(1)**, 23-36.

Culig, Z., Puhr, M. 2012. Interleukin-6: a multifunctional targetable cytokine in human prostate cancer. Molecular and Cellular Endocrinology. **360(1)**, 52-58.

Fani Makki, O., Afzali, N., Omidi, A. 2013. Effect of milk thistle seeds (Silybum marianum L.) on the immune system, intestinal related variables, appearance and mortality of broilers contaminated with Aflatoxin B1. Journal of Herbal Drugs. **4(1)**, 33-38.

Fani Makki, O., Omidi, A., Afzali, N., Sarir, H., Frouzanmehr, M., Shibak, A. 2014. Efficacy of Silybum Marianum Seeds in Ameliorating the Toxic Effects of Aflatoxin B1 in Broilers. Iranian Journal of Toxicology. **8(24)**, 977-982.

Gazak, R., Walterova, D., Kren, V. 2007. Silybin and silymarin-new and emerging applications in medicine. Current medicinal chemistry. **14(3)**, 315-338.

Grizzle, J., Hadley, T.L., Rotstein, D.S., Perrin, S.L., Gerhardt, L.E., Beam, J.D., Daniel, G.B. 2009. Effects of dietary milk thistle on blood parameters, liver pathology, and hepatobiliary scintigraphy in white carneaux pigeons (Columba livia) challenged with B1 aflatoxin. Journal of avian medicine and surgery. **23(2)**, 114-124.

Hinton, D.M., Myers, M.J., Raybourne, R.A., Francke-Carroll, S., Sotomayor, R.E., Shaddock, J., Chou, M.W. 2003. Immunotoxicity of aflatoxin B1 in rats: effects on lymphocytes and the inflammatory response in a chronic intermittent dosing study. Toxicological Sciences. **73(2)**, 362-377.

Kashofer, K., Viertler, C., Pichler, M., Zatloukal, K. 2013. Quality Control of RNA Preservation and Extraction from Paraffin-Embedded Tissue: Implications for RT-PCR and Microarray Analysis. PLoS ONE. **8(7)**, e70714.

Kearns, J. D., Basak, S., Werner, S. L., Huang, C. S., & Hoffmann, A. (2006). IκBε provides negative feedback to control NF-κB oscillations, signaling dynamics, and inflammatory gene expression. The Journal of Cell Biology. **173(5)**, 659-664.

Nasir, G. A., Mohsin, S., Khan, M., Shams, S., Ali, G., Khan, S. N., Riazuddin, S. 2013. Mesenchymal

stem cells and Interleukin-6 attenuate liver fibrosis in mice. Journal of Translational Medicine. **11(3)**, 78.

Osselaere, A., De Bock, L., Eeckhaut, V., De Backer, P., Van Bocxlaer, J., Boussery, K., Croubels, S. 2013. Hepatic and intestinal CYP3A expression and activity in broilers. Journal of veterinary pharmacology and therapeutics. **36(6)**, 588-593.

Yarru, L.P., Settivari, R.S., Gowda, N.K.S., Antoniou, E., Ledoux, D.R., Rottinghaus, G. E. 2009. Effects of turmeric (Curcuma longa) on the expression of hepatic genes associated with biotransformation, antioxidant, and immune systems in broiler chicks fed aflatoxin. Poultry Science. **88(12)**, 2620-2627.

Yunus, A.W., Razzazi-Fazeli, E., Bohm, J. 2011. Aflatoxin B1 in affecting broiler's performance, immunity, and gastrointestinal tract: A review of history and contemporary issues. Toxins. **3(6)**, 566-590.